



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Hydroxyapatit als Proteinadsorbens in
PLGA-Nanopartikeln“

verfasst von / submitted by

Verena Juritsch

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Möglichkeit, an diesem Thema zu arbeiten und die Hilfestellung und Unterstützung bei meiner Diplomarbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Mag. Julia Gausterer für die engagierte Betreuung und die guten fachlichen Ratschläge.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Michael Wirth und der gesamten Arbeitsgruppe für die Motivation und ein großartiges Arbeitsklima.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den Beistand während meiner gesamten Studienzeit, ohne sie wäre mir die Absolvierung meines Studiums nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich auch bei all meinen lieben Freunden bedanken, die stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
2. Nanopartikel in der pharmazeutischen Technologie.....	6
3. Experimenteller Teil.....	12
1. Materialien.....	12
1. PLGA-Nanopartikel.....	12
2. Hydroxyapatit.....	15
3. F- BSA.....	17
4. Pluronic F- 68.....	17
2. Methoden.....	18
1. Herstellungsprotokoll von Nanopartikeln mit Hydroxyapatit.....	18
1. Stammlösungen zur Hydroxyapatit Darstellung.....	19
2. Stammlösungen zur Nanopartikelherstellung.....	19
2. Herstellung der Nanopartikel.....	20
3. Reinigung der Nanopartikel.....	21
4. Lyophilisation der Nanopartikel.....	21
5. Hydrolyse der Nanopartikel.....	22

4. Ergebnisse.....	23
1. Einfluss von Hydroxyapatit auf Durchmesser und Polydispersitätsindex von PLGA-Nanosphären.....	23
2. Einfluss der molaren Verhältnisse der Hydroxyapatit- Stammlösungen und deren Absolutmengen auf die Partikelgröße und den PDI von PLGA-Nanopartikeln.....	25
3. Einfluss des Dispergiermediums auf die F-BSA Einbaurate der gereinigten PLGA-Nanopartikel.....	27
4. Einfluss des Hydroxyapatit-Types und -Gehaltes auf die F- BSA - Einbaurate von gereinigten PLGA-Nanosphären.....	29
5. Modellproteingehalt der Hydroxyapatit/PLGA-Nanosphären nach siebentägiger Inkubation in Glycin/NaOH Puffer.....	30
6. Einfluss des Dispergiermediums auf die Einbaurate nach 7- tägiger Inkubation in Glycin/NaOH Puffer.....	33
7. Einfluss von Volumen und Inkubationsdauer mit 20mM Glycin/NaOH-Puffer pH 7,0 auf den Modellproteingehalt von hydroxyapatithhaltigen PLGA-Nanosphären.....	35
8. Modellproteingehalt von hydroxyapatithaltigen und hydroxyapatitfreien PLGA-Nanosphären.....	36

5. Zusammenfassung.....	39
6. Literaturverzeichnis.....	40

1. Einleitung

Das pharmazeutische Forschungsfeld der Nanotechnologie ermöglicht eine Verringerung der Partikelgröße bis in den Nanometer- Bereich, welche eine moderne Form der Applizierbarkeit von biologischen Molekülen und Wirkstoffen eröffnet hat.

Prinzipiell muss ein Wirkstoff damit er nach der Applikation im hydrophilen physiologischen Milieu resorbiert werden kann und demnach eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit aufweist, eine Löslichkeit im wässrigen Medium aufweisen. Auf biologische Moleküle treffen diese hydrophilen Eigenschaften zwar meist zu, nur ist es hier eine Herausforderung an die pharmazeutische Technologie, Biomoleküle wie Nukleinsäuren, DNA oder siRNA, in die gewünschte Zielzelle zu transportieren, ohne dass sie vorher gelöst vorliegen und enzymatisch abgebaut wurden. Die oft vorhandene negative Ladung erschwert zusätzlich die Penetration durch die Zellmembran.

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) stellt als biokompatibles und bioabbaubares Polymer ein ideales Trägersystem für solche Arzneistoffe dar und erfreut sich deshalb und auf Grund der Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA) einer weit verbreiteten Anwendung in der Nanotechnologie. Es besitzt gut kalkulierbare Freisetzungseigenschaften, womit sich ein zielgerichteter Transport zur gewünschten Zelle bzw. zum gewünschten Gewebe erreichen lässt. Mit Hilfe des PLGA als Trägersystem lassen sich Fortschritte im ‚drug targeting‘ erreichen, allerdings ist es technologisch eine Herausforderung hydrophile Substanzen in das hydrophobe Polymer einzubauen, denn hier ist die Verkapselungsrate entsprechend gering. Während des Herstellungsprozesses der Nanopartikel ist auch die Gefahr gegeben, dass sich die hydrophilen Wirkstoffe in der wässrigen Phase der Emulsion lösen und nicht als Teil des therapeutischen Systems in den Nanopartikeln eingebaut werden.

Eine potentielle Hilfestellung bietet die anorganische, mineralische Verbindung Calcium- Phosphat, dessen Salz Hydroxyapatit die Grundsubstanz des Hartgewebes im menschlichen Körper darstellt. Calcium-Phosphat besitzt eine hohe Affinität zu hydrophilen Substanzen wie

Nukleinsäuren und eignet sich wegen seiner Biokompatibilität als Transportsystem durch die Zellmembran in die Zielzelle. [1]

Daher wird in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob mit dem Zusatz von Hydroxyapatit zu PLGA- Nanopartikeln die Einbaurate von Proteinen (bzw. von unserem Modellprotein F- BSA) verbessert werden kann.

2. Nanopartikel in der Pharmazeutischen Technologie

Nanotechnologie umfasst Strukturen im Nanometerbereich, wobei sie meist 100 Nanometer oder auch noch kleiner sind. Die verringerte Größe ergibt eine Clusterbildung der Atome und eine veränderte Anordnung der Oberflächenatome, sodass einzigartige, veränderte physikalische und chemische Eigenschaften resultieren.

Somit ist die Nanotechnologie ein aufstrebendes, interdisziplinäres Forschungsfeld, dessen Anwendung in der Behandlung, Diagnose, Monitoring und Prävention von Krankheiten als ‚Nanomedizin‘ einen hohen Stellenwert erreicht hat. Bereits in den letzten Jahren sind nanotechnologische Strukturen und Prozesse vermehrt in den Fokus der pharmazeutischen Forschung gerückt. Forschungsprojekte in der pharmazeutischen Technologie beschäftigen sich mit dem Arzneistofftransport zur gewünschten Zelle bzw. Rezeptor und ermöglichen die Erkennung und Identifikation von spezifischen Targets als Angriffspunkte für Wirkstoffe.

So können geeignete Nanotransportsysteme entwickelt werden, um eine spezifische Wirkung an einem präzisen Wirkort im Organismus zu erzielen. Dadurch können auch Nebenwirkungen der

Arzneimitteltherapie durch Einschränkung unerwünschter Interaktionen mit dem gesunden Gewebe minimiert werden. [2]

Die Nanomedizin lässt sich allgemein in verschiedene Unterbereiche einteilen: Nanopartikel als biologische Mimetika, die eine natürliche, biologische Wirkung nachahmen, Nanomaschinen oder Nanoroboter, die als autonome Kleinstmaschinen beispielsweise in der DNA-Technologie eingesetzt werden, Nanogewebe und polymere Nanostrukturen, die als biopharmazeutische Ausgangsmaterialien im Bereich des „tissue engineering“ im Vormarsch sind.

Das Verhältnis der Oberfläche zur Masse bei Nanopartikeln ist um einiges größer als jenes von anderen Partikeln. Auf Grund dieser einzigartigen Eigenschaften haben Nanopartikel eine große spezifische Oberfläche, ermöglichen eine erleichterte Distribution und eine erhöhte Dissolutionsgeschwindigkeit, welches sie für den Einsatz als Trägersysteme im Nanobereich prädestiniert. [3]

Die genannten Nanoarzneiformen ermöglichen den zielgerichteten Transport einerseits von erprobten Wirkstoffen, die bei herkömmlicher Applikationsform eine Vielzahl von unerwünschten Wirkungen hervorrufen und andererseits von schwer applizierbaren biologischen Molekülen, wie hydrophilen Proteinen, DNA oder Nukleinsäuren und haben sich so schnell eine führende Rolle in pharmazeutischen Forschungsprozessen gesichert. [2]

Es werden verschiedene nanoskalige Formulierungen unterschieden. (Abbildung 1) Nanopartikel sphärischer Natur und Liposomen werden neben polymeren Mizellen und Dendrimeren in neuesten therapeutischen Systemen genutzt. Nanomolekulare Röhren aus Kohlenstoff finden industriell in der Mechanik und technischen Branche ein weites Anwendungsfeld.

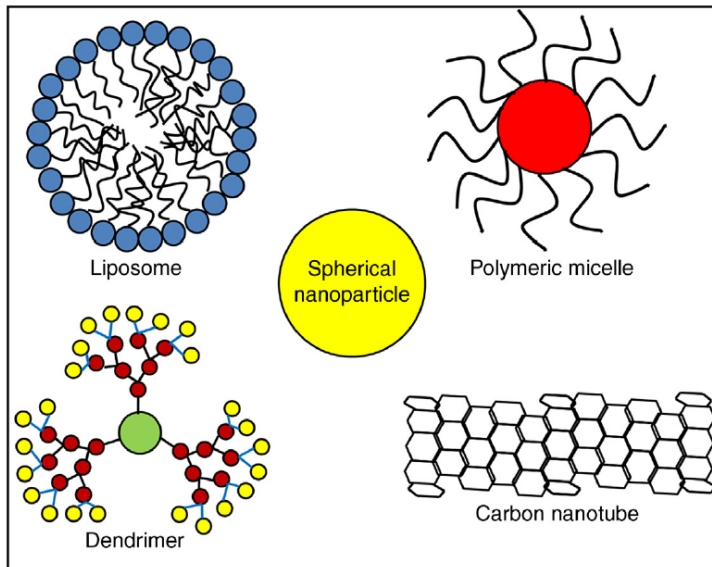


Abbildung 1: Unterschiedliche nanoskalige Formulierungen [3]

Zur Synthese von polymeren Nanomaterial werden verschiedene Polymere, wie Polyethylenglykol und PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) und deren Derivate eingesetzt. Nanofällung und Wasser- in-Öl Emulsionen sind unter anderem Methoden zur Herstellung von polymeren Nanopartikeln unter der Verwendung von PLGA. Verschiedene andere Methoden sind in Abbildung 2 aufgelistet. [3]

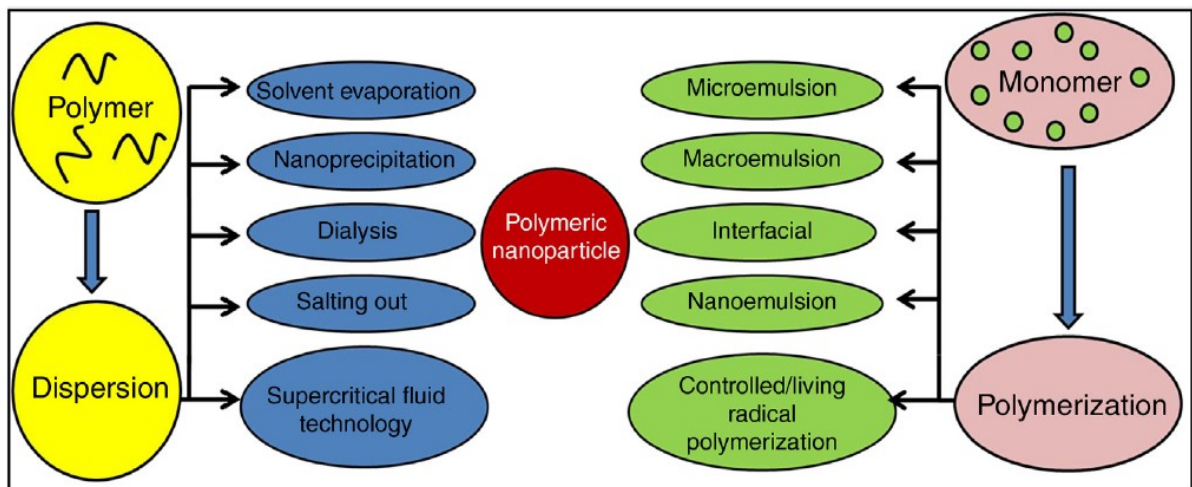


Abbildung 2: Verschiedene Methoden zur Herstellung von polymeren Nanopartikeln [3]

Derartige Herstellungstechnologien ermöglichen also eine Fabrikation von nanoskaligen Strukturen, die als Trägersysteme für Wirkstoffe zur spezifischen Behandlung von Krankheiten konstruiert werden. Mit ihrer Hilfe können Arzneistoffe mit unterschiedlichem Molekulargewicht sowie große, hydrophile Biomoleküle zielgerichtet und zeitabhängig transportiert und freigesetzt werden. Diese partikulären Trägersysteme schützen außerdem empfindliche Wirkstoffe durch Verkapselung und ermöglichen so erst deren Applikation, da sie in anderen Darreichungsformen nicht bioverfügbar sind.

Durch diese Spezifität werden Nebenwirkungen minimiert und die Effizienz und Effektivität der Wirkung erhöht, weshalb pharmazeutische Formulierungen im Nanometerbereich als kolloidale Applikationsform rasch einen hohen Stellenwert in der pharmazeutischen Forschung erlangt haben. [3]

Einige Anwendungsgebiete der Nanopartikel im medizinisch / pharmazeutischen Bereich sind:

- „Drug delivery“ Systeme
- „Gene delivery“ Systeme
- Proteindetektion
- Fluoreszenz- markierte biologische Kennzeichnungen für biologische Marker und Moleküle zur Erforschung und Diagnose von Krankheiten
- Biologische Detektion von Krankheiten verursachenden Organismen
- Isolierung und Reinigung von biologischen Molekülen und Zellen in der Forschung
- Tissue Engineering
- Erforschung der DNA- Struktur
- Tumorthherapie
- Pharmakokinetische Studien [3]

Daher besitzt die Nanotechnologie bereits ein breites Einsatzfeld, sodass dennoch oder gerade deshalb die Abklärung des toxischen Potentials unabdingbar ist. Da Nanopartikel bedingt durch ihre Kleinheit in Boden und Grundwasser gelangen können, stellen sie eine mögliche Belastung für die Umwelt und den menschlichen Organismus dar. Die Partikel können durch Nahrungsaufnahme oder Inhalation in den Körper gelangen und wandern, bedingt durch ihre kleine Größe und hohe Reaktivität, zu verschiedenen Organen und Geweben. Dort könnten sie zelltoxisches Potential entfalten und toxikologische Auswirkungen auf die betroffene Körperregion wären möglich. [4]

Die in der Nanobiotechnologie schnell fortschreitenden Forschungen eröffnen innerhalb kürzester Zeitspannen vielversprechende pharmazeutische Anwendungen, ohne dass derzeit mögliche Risiken einer Langzeitanwendung für den menschlichen Organismus und für die Umwelt abgeschätzt werden können. Eine toxikologisch relevante Fähigkeit von Nanostrukturen ist, sich, abhängig von ihrer Größe, Form, Oberflächencharakteristik oder gebundene funktionelle Gruppen an ihrer Oberfläche, an Proteine anzulagern und somit die biologische Aktivität der betroffenen Proteine zu verändern und zu beeinträchtigen. Es ist jedoch auch anzunehmen, dass die Auswirkungen der Nanopartikel auf die Umwelt zukünftig steigen werden. [4]

Insgesamt birgt die Nanotechnologie in der Biopharmazie weiterhin ein hohes Potential und wird auch zukünftig in modernen ‚drug targeting‘- Technologien eine bedeutende Rolle spielen. Dabei müssen aber die oben beschriebenen Gefahrenpotentiale der Anwendung beobachtet und berücksichtigt werden. [4]

Neben der potenziellen Toxizität der Nanotechnologie, gilt es jene Problemstellung zu beachten, dass hydrophobe Nanopartikel kaum dazu geeignet sind, eine bedeutende Gruppe an Wirkstoffen- den hydrophilen Arzneistoffen, wie die meisten Proteine, einzubauen. Um dieser Herausforderung zu begegnen könnte Hydroxyapatit als adsorbierender hydrophiler Bestandteil in der Nanopartikelmatrix sinnvoll sein. [5]

3. Experimenteller Teil

3.1. Materialien

In den folgenden vier Unterpunkten werden die verwendeten Materialien charakterisiert.

3.1.1. PLGA- Nanopartikel

Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ist ein biokompatibles, bioabbaubares Copolymer, das durch eine unspezifische Hydrolyse zu Milchsäure und Glykolsäure metabolisiert wird und somit eine geringe Toxizität aufweist. Es ist von der FDA (Food and Drug Administration) und EMA (European Medicine Agency) für die Anwendung am Menschen zugelassen. In der Pharmazie wird das Polymer als Basis für Depotarzneiformen, wie Implantaten eingesetzt, wo eine Absorptionskinetik 0. Ordnung angestrebt und durch PLGA auch realisierbar wird. [6]

In den folgenden Experimenten wurde ein Poly (D,L- lactide-co-glycolide) 50:50 (Resomer©) verwendet, welches aus 50% Milchsäure und 50% Glykolsäure besteht und von allen Copolymeren die rascheste Wirkstofffreisetzung zeigt. [7]

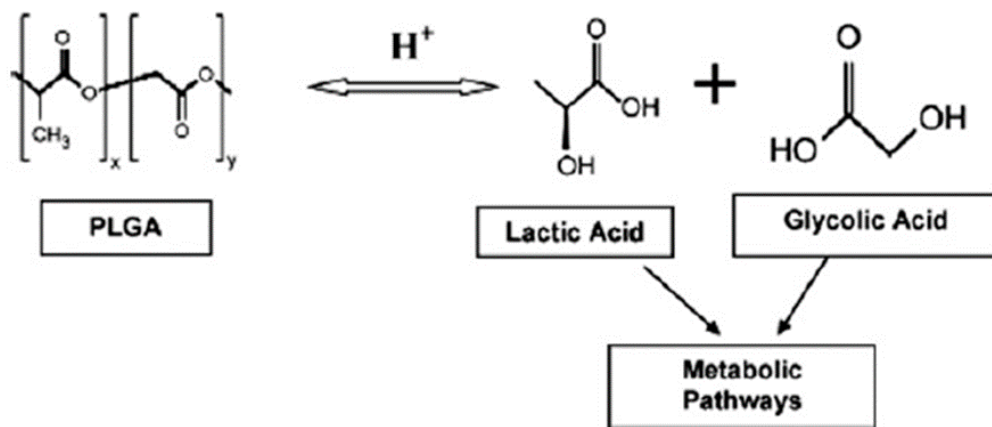


Abbildung 3: Strukturformel von PLGA - x steht für Milchsäure- Einheiten, y steht für Glykolsäure- Einheiten [6]

Der Polyester dient als Matrix für die Herstellung von Partikeln im Mikro- sowie Nanometerbereich.

PLGA-Nanopartikel sind wasserunlöslich und hydrophob. Der menschliche Körper erkennt Partikel mit einem Durchmesser größer als 70 Nanometer prinzipiell als artfremd und entfernt diese mit Hilfe von Phagozyten, Mikro- und Makrophagen des retikulohistiozytären Systems, das als Teil des Immunsystems für die Entfernung und Beseitigung von Fremdpartikeln und Krankheitserregern zuständig ist, rasch aus dem Blutkreislauf und reichert sie schlussendlich in Leber und Milz an. Da diese physiologische Gegebenheit die Anwendung von PLGA-Partikeln stark einschränken würde, kann die Partikeloberfläche modifiziert werden, damit sie vom retikulohistiozytären System nicht erkannt und folglich nicht sofort abgebaut oder abtransportiert werden. Dazu können die Partikeloberflächen mit hydrophilen, proteinabstoßenden Strukturen wie Polyethylenglykol oder Poloxamer (wie Pluronic® F- 68) derivatisiert werden, um als „stealth particles“ durch das retikulohistiozytäre System nicht erkannt zu werden.

Darüber hinaus werden positiv geladene Strukturen bevorzugt in Zielzellen aufgenommen, da sie mit negativ geladenen

Strukturelementen der Zellmembran interagieren können und durch unspezifische adsorptive Endozytose internalisiert werden können. PLGA-Partikel vom „H-Typ“ weisen durch Carboxylatgruppen an der Oberfläche eine negative Ladung auf und profitieren hier von der PEGylierung durch Poloxamer, die negative Ladungen abschirmen kann und so die Oberflächenladung in den positiveren Bereich verschiebt. [6]

Ein wesentlicher Vorteil von Mikro- und Nanopartikeln besteht im Schutz des in der Matrix eingeschlossenen Arzneistoffes vor ungünstigen Einflüssen wie vorzeitigem Abbau durch pH-Wert und Enzyme. Somit wird die Stabilität des Wirkstoffes erhöht und auch eine Zielorientierung möglich. [1]

Ein Nachteil des hydrophoben Polyesters besteht jedoch darin, dass - bedingt durch Abstoßung - hydrophile Wirkstoffe insbesondere aus der Biotech-Pipeline wie Peptide, Proteine, DNA oder auch siRNA in funktionell integrierter Form kaum eingebaut werden können. Die Einbaurate ist üblicherweise kleiner als 1%. [7] Daher sollte in dieser Diplomarbeit der Einsatz von Hydroxyapatit als Hilfsmittel zur Erhöhung der Einbaurate untersucht werden.

3.1.2 Hydroxyapatit

Als Apatit werden generell kristalline Strukturen mit einer Summenformel $M_{10}(ZO_4)X_2$ bezeichnet, wobei jede Variable durch eine Vielzahl an Ionen ersetzt werden kann: Beispielsweise für M: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , für ZO_4 : PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , SO_4^{2-} und für X: OH, F⁻, Cl⁻, Br⁻.

Wenn die Summenformel folgendermaßen aussieht: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ und ein molares Verhältnis von Calcium zu Phosphat von 1,67 vorliegt, wird die Substanz als Hydroxyapatit oder Hydroxylapatit bezeichnet. [8]

Hydroxyapatit bildet die Grundlage der Hartschubstanz aller Wirbeltiere und entsteht im Körper durch Mineralisation. Es ist somit ein Hauptbestandteil von Knochen, Zähnen und mineralisierten Sehnen und sorgt hier für mechanische Stabilität und Härte. Hydroxyapatit hat osteokonduktive Fähigkeiten und ist somit als natürliches Leitgerüst in der Lage, das Knochenwachstum zu erleichtern. Zahnschmelz kann mit Hydroxyapatit repariert werden, daher wird es als Zusatzstoff in Zahncremes verwendet. [5]

In der Industrie kommt es als Phosphatdünger zum Einsatz; hier liegen Harnstoff und Hydroxyapatit im molaren Verhältnis von 6:1 vor, sodass ein Hydroxyapatit-Molekül sechs Harnstoff-moleküle binden kann. Die Wasserlöslichkeit wird folglich vermindert und die Nitrifikation - die bakterielle Oxidation von Ammoniak - verlangsamt. In der Proteinchromatographie kann es als stationäre Phase fungieren und wird als Adsorbens für Einzel- und Doppelstrang-DNA eingesetzt.

Hydroxyapatit weist ein hexagonales Kristallsystem auf, kann durch seine Eigenschaften saure und basische Proteine binden und eignet sich damit gut als Carrier für den Arzneistofftransport wie Wachstumsfaktoren, Antibiotika oder Chemotherapeutika. [5]

Um Hydroxyapatit aus einer wässrigen Lösung zu erhalten, muss ein molares Verhältnis zwischen $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ von 1,67 vorliegen und ein pH- Bereich von 9,5 - 12 eingehalten werden.

In der Natur liegen Apatite in verschiedenen Formen vor, wobei in folgenden Untersuchungen Strukturen aus Tabelle 1 genutzt werden. [8]

Tabelle 1: Gekürzte Übersicht über verschiedene Arten von Hydroxyapatit [8]

Ca/P Molverhältnis	Summenformel	Bezeichnung	Wasser- löslichkeit (g/L)	pH- Stabilität (bei 25°C)
1,5 - 1,67	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x} \times (\text{OH})_2$ (0 < x < 1)	Calcium- defizitärer Hydroxyapatit	ca. 0,0094	6,5 - 9,5
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatit	ca. 0,0003	9,5 - 12
2,0	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Tetracalciumphosphat	ca. 0,0007	/

In folgenden Experimenten werden verschiedene molaren Verhältnisse von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ zueinander untersucht, wobei das Ausgangsverhältnis (=Standardverhältnis), das dem natürlichen Hydroxyapatits, 1,67, entspricht.

3.1.3 F- BSA - Der Modellwirkstoff

BSA steht für bovines Serumalbumin, ein Plasmaprotein vom Rind mit einem Molgewicht von 67 kDa. Durch kovalent gebundenes Fluorescein wird das Protein leicht detektierbar, was für die Quantifizierung einen wesentlichen Vorteil darstellt.

Albumin macht ca. 60% der Gesamtproteinmenge des Blutplasmas aus und gewährleistet die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, der die Flüssigkeitsverteilung im Körper bestimmt. Sinkt der kolloidosmotische Druck, dann strömt Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Interstitium und verursacht Ödeme. Des Weiteren ist Albumin im Organismus ein Transportprotein für Bilirubin, Fettsäuren, Thyroxin oder Calcium und insbesondere hydrophobe Wirkstoffe. [9]

3.1.4. Pluronic(©) F68

Pluronic(©) F68 ist ein nicht ionisches, amphiphiles Makromolekül. Das nichtionogene Tensid stellt ein Blockpolymer aus Polyethylenoxid (PEO)- und Polypropylenoxid (PPO)- Einheiten dar (Abbildung 4), wobei sich die unterschiedlichen Typen in der Kettenlänge und damit in ihrem HLB- Wert (Hydrophilic-lipophilic-balance) unterscheiden. Bei Nanopartikeln wird angenommen, dass die hydrophoben PPO-Blöcke das Poloxamer an der PLGA- Partikeloberfläche verankern, während die hydrophilen PEO-Fragmente kammartig in die Lösung reichen. Durch die Hydrophilisierung der Oberfläche stabilisiert Pluronic die PLGA-Nanotröpfchen und Nanopartikel und verhindert somit die

Agglomeration zu größeren Aggregaten. Zusätzlich könnte es durch den wasseranziehenden Effekt die Freisetzungsraten von verkapselten Wirkstoffmolekülen (Arzneistoffen, Proteinen, DNA) erhöhen. [10]

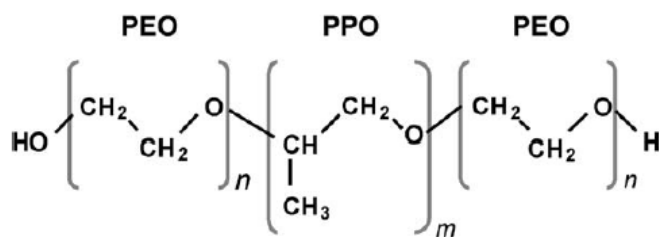


Abbildung 4: Strukturformel des Poloxamers Pluronic. Hydrophobe PPO-Fragmente, $m = 30$; hydrophile PEO-Fragmente $n = 75$) [10]

3.2. Methoden

3.2.1: Herstellungsprotokoll von Nanopartikeln mit Hydroxyapatit

Im Folgenden wird die erarbeitete Anleitung zur Bereitung der Nanopartikeln beschrieben.

3.2.1.1: Stammlösungen zur Hydroxyapatit- Herstellung (im Standardverhältnis)

- Stammlösung 1: 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in Aqua Dest. (partikelfrei filtriert)
- Stammlösung 2: 16 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in Aqua Dest. (partikelfrei)

Partikelfrei filtriert wurde mit Hilfe eines Filters aus der Zellkultur - einem Stericup™ Filtrationssystem mit 500ml Kapazität unter Anlegen eines Vakuums.

3.2.1.2: Stammlösungen zur Nanopartikelherstellung

- F- BSA: 5 mg F- BSA pro ml der eingesetzten Stammlösungen
- PLGA: 100 mg PLGA RG 503 H in 2,4g Ethylacetat
- Pluronic F- 68: Hier werden zwei Lösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt:
 - 9,6 ml einer 10%igen Pluronic F-68 Lösung in destilliertem Wasser (partikelfrei filtriert)
 - 100 ml einer 0,1%igen Pluronic F-68 Lösung in destilliertem Wasser (partikelfrei filtriert)

3.2.1.3. Herstellung der Nanopartikel

PLGA Nanopartikel werden nach der W/O/W ‚solvent evaporation‘ Methode, modifiziert nach Protokoll nach (Dördelmann G., Kozlova D., Karczewski S., Lizio R., Knauer S., Epple M., 2014. Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L- lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery, Journal of Materials Chemistry B, 7250 - 7259) hergestellt:

Jeweils 2,0 mg F-BSA werden in je 400 µl partikelfreier Phosphat- bzw. Calcium- Stammlösung in je einem Eppendorfgefäß gelöst. Danach werden jedem Eppendorfgefäß 1200µl PLGA-Ethylacetat-Lösung zugesetzt und mit 40% Intensität für 20 Sekunden beschallt. Die beiden Emulsionen werden in einem 25ml Becherglas vereinigt und mit 40% Intensität für zwei Minuten beschallt, bis eine milchig-weiße Trübung durch die Bildung der W/O-Emulsion eintritt. Nun werden der Emulsion 9,6 ml 10%ige wässrige Pluronic F- 68 Lösung in einem Schuss zugesetzt und mit 40% Intensität für zwei Minuten beschallt.

Anschließend wird die W/O/W- Emulsion in 100 ml 1%ige wässrige Pluronic F- 68-Lösung eingebracht und 45 Minuten am Magnetrührer zur Aushärtung der Nanopartikel inkubiert.

Schließlich wird das Ethylacetat am Rotavapor abgedampft und die Nanopartikel-Suspension bis zur Weiterverarbeitung unter Lichtschutz im Kühlschrank gelagert.

3.2.2. Reinigung der Nanopartikel

Um nicht verkapseltes Material vollständig abzutrennen, wird die Nanopartikel-Suspension in drei aufeinanderfolgenden, identischen Waschschritten gereinigt. Dazu wird die Partikelsuspension 30 Minuten bei 17000 UpM und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit gelösten Anteilen verworfen. Das Pellet wird auf Farbe, Form und Größe beurteilt, um auf die Effizienz des Einbaus anhand der eingesetzten Menge an Protein, der variierten molaren Konzentration des Ca/P- Verhältnisses und des Dispergiermediums zu schließen. Das Pellet wird in 10 ml 0,1%ige wässrige Pluronic F- 68- Lösung aufgenommen und mit dem Ultraschallstab 2x10 Sekunden resuspendiert. Danach wird wieder wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach dem dritten Zentrifugierschritt wird das Pellet in 40 ml 0,1%ige wässrige Pluronic F- 68- Lösung aufgenommen.

3.2.3. Lyophilisation der Nanopartikel

Für die Lyophilisation wird 1,0 ml gereinigte Nanopartikelsuspension in ein tariertes zwei-Milliliter-Eppendorfgefäß eingebracht, mit einem perforiertem Parafilm verschlossen und 24 Stunden lang bei -20°C durchgefroren. Nun werden die vorbereiteten Gefäße lyophilisiert. Die Lyophilisation stellt ein schonendes Verfahren zur Trocknung für hitzeempfindliche Wirkstoffe dar, wobei hier durch Sublimation der Eiskristalle eine Gefriertrocknung (der Übergang vom festen Aggregatzustand direkt in den

gasförmigen) erreicht wird. [11]

Die durchgefrorenen Eppendorfgefäße werden in den Gefriertrockner (Christ alpha 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) eingebracht und unter Verwendung der Vakuumpumpe (Pfeiffer Vaccum, Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar, Deutschland) lyophilisiert.

Es wird eine Haupttrocknung für zumindest 22 Stunden (bei -30 °C, 0,37 mbar) durchgeführt und eine Nachtrocknung von 2 - 3 Stunden (bei -55 °C, 0,021 mbar).

Beendet ist der Prozess, wenn das Lyophilisat vollständig getrocknet ist und den festen Aggregatzustand aufweist. Zum Schluss wird der Parafilm entfernt, die Gefäße verschlossen und nach der genauen Auswaage bis zur weiteren Verarbeitung im Exsikkator gelagert.

3.2.4. Hydrolyse der Nanopartikel

Das ausgewogene Lyophilisat wird mit 1,0 ml 1M Glycin/NaOH Puffer pH 11,00 inkubiert. Unter Rühren mittels Magnetrührstäbchen am Magnetrührer (mittlere Reglerstellung) und Lichtschutz werden die Proben bei Raumtemperatur über einen festgelegten Zeitraum hydrolysiert und schließlich pH-Wert und Fluoreszenzintensität bestimmt.

4. Ergebnisse

Anhand nachfolgender Experimente können reproduzierbare und adäquate Aussagen zur Fragestellung getätigt werden.

4.1 Einfluss von Hydroxyapatit auf Durchmesser und Polydispersitätsindex von PLGA- Nanosphären

Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob Hydroxyapatit die Größe und Größenverteilung der PLGA-Nanopartikel beeinflusst. Dazu wurden Nanopartikel mit Hydroxyapatit wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben hergestellt. Als Vergleich dienten Partikel, bei denen die Phosphat- und die Calciumchlorid-Lösung durch destilliertes Wasser (partikelfrei filtriert) ersetzt wurde. Die Partikel wurden mit unterschiedlichen Mengen an F-BSA beladen, jedoch nicht explizit gereinigt.



Abbildung 5: Einfluss von Hydroxyapatit (Ca/P) auf Durchmesser und Polydispersitätsindex (PDI) von F-BSA-haltigen PLGA-Nanosphären

Wie die in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, ändert sich der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel durch Einbau von Hydroxyapatit nicht signifikant. Bei näherer Betrachtung der Mittelwerte zeigt sich jedoch, dass durch Hydroxyapatit- gebundenes Protein der Partikeldurchmesser um etwa 10 nm zunimmt. Der Hydroxyapatitgehalt allein beeinflusst die Partikelgröße nicht, da proteinfreie und proteinhaltige Partikel den gleichen Durchmesser besitzen. Der Hydroxyapatitgehalt wirkt sich ebenfalls nicht auf die Partikelgrößenverteilung aus und liegt in jedem Fall in bzw. nahe einer monomodalen Größenverteilung. Die Polydispersität steigt jedoch geringfügig mit dem Proteingehalt der Nanopartikel, liegt aber trotzdem in einem sehr engen Größenbereich.

Insgesamt wirkt sich der Proteingehalt der Nanopartikel auf die Partikelgrößencharakteristik aus, die Gegenwart des Proteinträgermaterials Hydroxyapatit bleibt ohne Effekt.

4.2 Einfluss der molaren Verhältnisse der Hydroxyapatit-Stammlösungen und deren Absolutmengen auf die Partikelgröße und den PDI von PLGA-Nanopartikeln

Wie in Tabelle 1 erwähnt, besitzt der calciumdefizitäre Hydroxyapatit ein Ca/P-Verhältnis von 1,67:1,0, während Tetracalciumphosphat eines von 2:1 aufweist. Beide Arten des Hydroxyapatits sind nahezu wasserunlöslich, calciumdefizitärer Hydroxyapatit jedoch noch 14mal schlechter als Tetracalciumphosphat. Im Rahmen des folgenden Experiments sollte untersucht werden, ob sich einerseits die Art des Hydroxyapatits - d.h. calciumdefizitärer Hydroxyapatit oder Tetracalciumphosphat - und andererseits die Gesamtmenge an Hydroxyapatit pro Ansatz auf die Größenparameter der Nanopartikel auswirkt.

Die Nanopartikel wurden wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben hergestellt, jedoch wurden nicht nur eine 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und eine 16 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ Stammlösung, sondern auch eine 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und eine 40 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ Lösung eingesetzt, um die molaren Ca/P-Verhältnisse von beiden Hydroxyapatit-Arten vorzulegen. Um den Hydroxyapatitgehalt der Nanopartikel zu erhöhen, wurden zusätzlich Stammlösungen mit verdoppeltem Calciumchloridgehalt (32 mM und 40 mM) bzw. Natriumphosphatgehalt (20 mM) zur Partikelherstellung verwendet. Nanopartikel ohne Hydroxyapatit, die nach exakt dem gleichen Herstellungsprotokoll und Herstellungsbedingungen dargestellt wurden, dienen als Bezugspartikel.

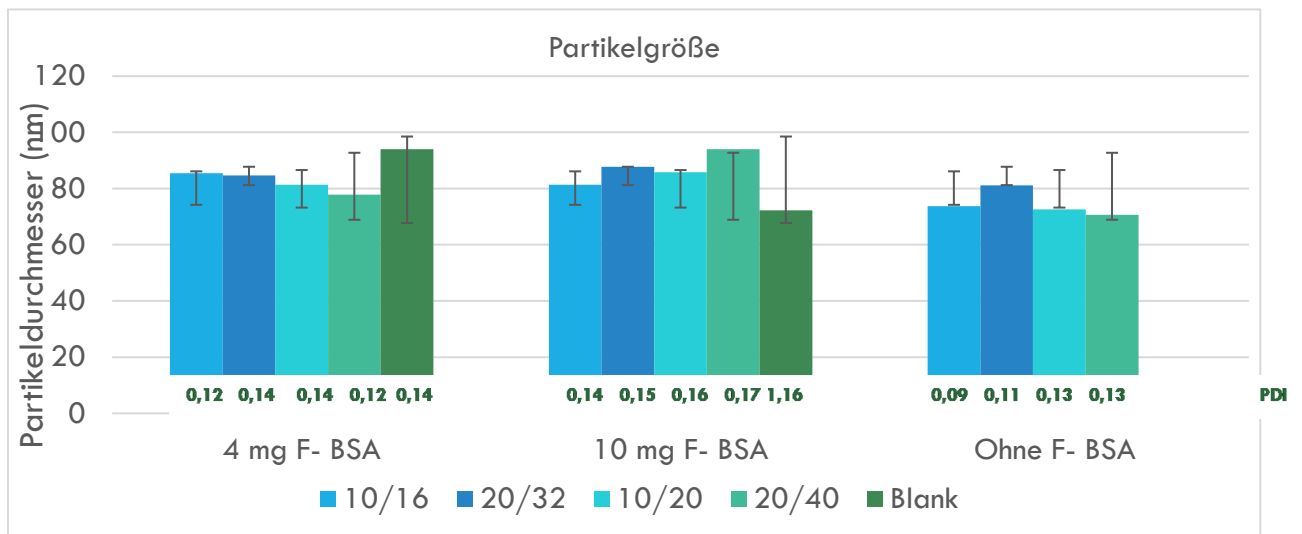


Abbildung 7: Einfluss der verschiedenen Molaren Verhältnisse der Hydroxyapatit- Stammlösungen und deren Absolutmengen auf die Partikelgröße und den PDI der PLGA-Nanopartikel

Alle in Abbildung 7 angegebenen Partikeldurchmesser der Nanopartikel liegen im Bereich der Standardabweichungen und sind daher als weitgehend unverändert zu betrachten. Auch die Polydispersitätsindices als Maß für die Schwankungsbreite der Partikelgrößenverteilung liegen in einem engen Bereich und beweisen die relativ enge Korngrößenverteilung der Nanopartikelchargen. Weder der beabsichtigte calciumdefizitäre Hydroxyapatit oder Tetracalciumphosphat, noch die Verdoppelung des Hydroxyapatitgehalts in den Nanopartikeln bewirkte eine Änderung der Größenparameter. Einzig der Proteineinbau zeigte im Mittel Auswirkungen. Nanopartikel ohne F-BSA sind im Mittel geringfügig kleiner als solche mit eingebautem Protein.

Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die Robustheit der Methode zur Herstellung der proteinbeladenen Nanopartikel, da beträchtliche Variationen der Herstellungsparameter kaum messbare Änderungen von Partikeldurchmesser und Partikelgrößenverteilung bewirken.

4.3 Einfluss des Dispergiermediums auf die F-BSA Einbaurate der gereinigten PLGA-Nanopartikel

Die Notwendigkeit einer gewissen Ionenstärke und pH Stabilität während der Herstellung und Reinigung sollte im Folgenden untersucht werden. Dabei wurde als Kenngröße der Proteingehalt der Nanopartikel herangezogen, da die vorangegangenen Versuche die Robustheit der Herstellungsmethode in Bezug auf Partikelgröße und deren Verteilung bestätigt haben. Zusätzlich wurden die Partikel nicht direkt nach der Herstellung, sondern erst nach Entfernung des möglicherweise ungebundenen, fluoreszierenden Proteins durch Zentrifugation und anschließend Lyophilisation auf ihren Modellproteingehalt untersucht.

Zu diesem Zweck wurde 20mM HEPES Puffer pH 7 als Dispergiermedium alternativ zu partikelfreiem, destilliertem Wasser in den einzelnen Arbeitsschritten, wie in Abschnitt 3.2. beschrieben, eingesetzt.

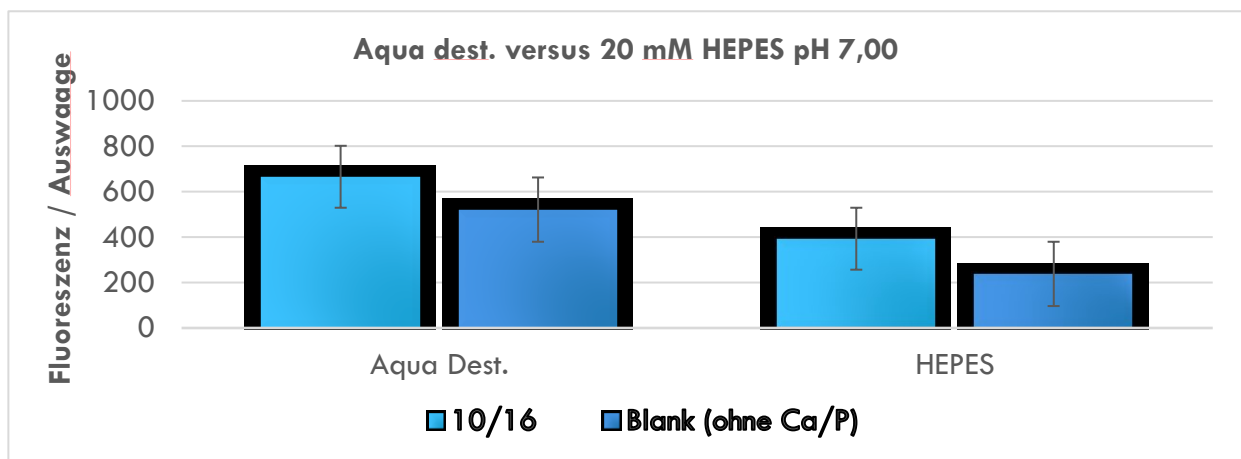


Abbildung 8: Einfluss des Dispergiermediums auf die F- BSA Einbaurate von gereinigten PLGA-Nanopartikeln

Trotz eines optimalen Partikelgrößendurchmessers von 80 Nanometer direkt nach der Herstellung aller Chargen, zeigte bereits während der Reinigung der Partikel durch Zentrifugation der Überstand jener Nanopartikeln, die mit 20 mM HEPES-Puffer pH 7,0 hergestellt wurden, eine deutliche Färbung durch das freie, nicht eingebaute Modellprotein. Im Gegensatz dazu war der Überstand jener Nanopartikel, die mit destilliertem Wasser hergestellt wurden, nahezu farblos, während der Niederschlag aus Nanopartikeln deutlich gelb gefärbt war. Damit war es ohne fluorimetrische Bestimmung augenscheinlich, dass in Gegenwart von destilliertem Wasser mehr Modellprotein eingebaut wird als in Gegenwart von HEPES-Puffer pH 7,0.

Die in Abbildung 8 dargestellten Messergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. Der Proteingehalt, ausgedrückt als gemessene Intensität des Fluoreszenzlabels von F- BSA bezogen auf die Auswaage der erhaltenen getrockneten Nanopartikel, unterscheidet sich signifikant je nach eingesetztem Lösungsmittel. Nanopartikeln, die mit destilliertem, partikelfreiem Wasser hergestellt und gereinigt wurden, enthalten um etwa 40% mehr Protein als jene, bei denen HEPES Puffer zum Einsatz gekommen ist. Zusätzlich ist in Abbildung 8 eindeutig zu sehen, dass in „Blank“- Partikel (ohne Hydroxyapatit) im Mittel um 23% weniger Protein verkapselt werden konnte, als jene mit Hydroxyapatit.

Somit ist belegt, dass eine effektive Herstellung und Reinigung der Nanosphären keine Ionenstärke und damit verbesserte Proteinlöslichkeit erfordert, da in Gegenwart von 20mM HEPES Puffer pH 7 die Proteineinbaurate deutlich abnimmt. Andererseits beweist der deutlich höhere Proteingehalt der hydroxyapatithältigen Nanopartikel, dass das Mineral - möglicherweise durch Proteinadsorption - den Einbau von hydrophilen Stoffen in eine lipophile Matrix ermöglicht.

4.4 Einfluss des Hydroxyapatit-Types und -Gehaltes auf die F- BSA - Einbaurate von gereinigten PLGA-Nanosphären

Während in dem in Kapitel 4.2. angeführten Experiment der Einfluss des Hydroxyapatit-Types und -Gehaltes auf die Partikelgrößencharakteristik an Hand von ungereinigten Nanosphären untersucht wurde, erfordert die Quantifizierung des Modellproteingehaltes der Nanosphären die Abtrennung von nicht-eingebautem Protein und damit einen Reinigungsschritt, der durch Zentrifugation erfolgte.

Dazu wurden die Partikel wie in Kapitel 4.2. beschrieben mit der einfachen und doppelten Menge sowohl an calciumdefizitären Hydroxyapatit als auch Tetracalciumphosphat hergestellt, gereinigt und lyophilisiert. Schließlich wurden deren F-BSA Gehalt jenem von calciumphosphatfreien Nanopartikeln gegenübergestellt.

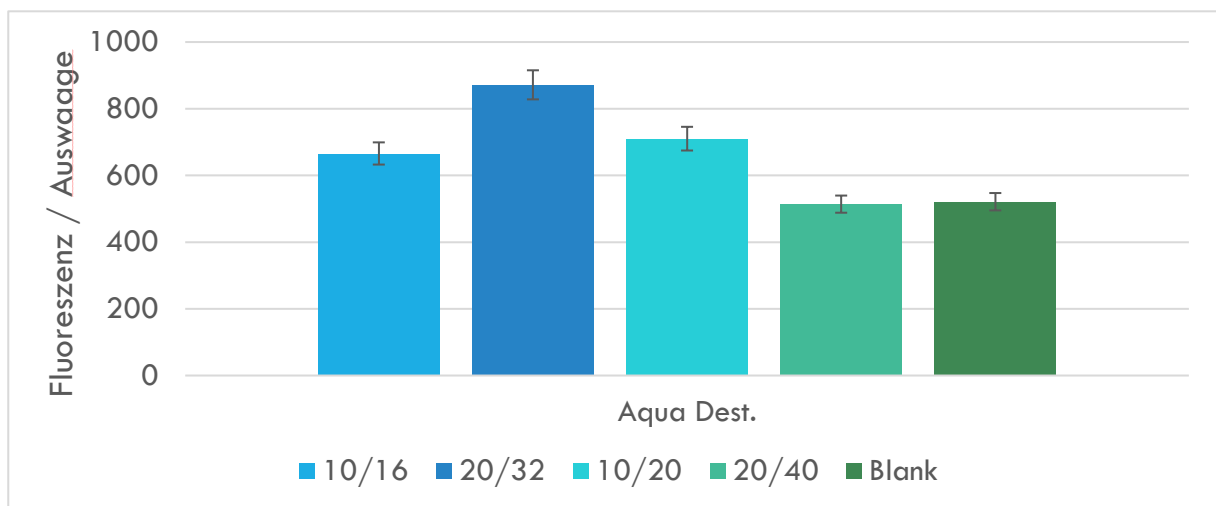


Abbildung 9: Einfluss des Hydroxyapatit-Types und -Gehaltes auf die F- BSA - Einbaurate von gereinigten PLGA-Nanosphären

Die Partikel dieses Experiments weisen im Schnitt einen hydrodynamischen Durchmesser von 87 nm mit einem mittleren Polydispersitätsindex von 0,12 auf, sodass die Partikelchargen von der Größencharakteristik vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu zeigen die in Abbildung 9 angeführten Ergebnisse klar den Einfluss des Hydroxyapatit-Typs und - Gehalts auf die Einbaurate des Modellwirkstoffes. Die Gegenwart von calciumdefizitärem Hydroxyapatit bewirkt einen um 27% höheren F-BSA Gehalt, die Verdoppelung dieser Hydroxyapatitmenge erhöht den F-BSA Einbau in die Nanopartikel sogar um 67% im Vergleich zu Nanopartikeln ohne Hydroxyapatit. Wird Tetracalciumphosphat als Adsorbens in den Nanopartikeln eingesetzt, so steigt der Proteingehalt um 36%, eine Verdoppelung der Tetracalciumphosphat-Menge beeinflusst die Einbaurate nicht.

Daher bewirkt calciumdefizitärer Hydroxyapatit in den PLGA-Nanopartikeln eine deutliche Erhöhung der Proteineinbaurate, wobei offenbar eine größere Menge von Hydroxyapatit von Vorteil ist.

4.5 Modellproteingehalt der Hydroxyapatit/PLGA-Nanosphären nach siebentägiger Inkubation in Glycin/NaOH Puffer

Bisher beruhte die Erfassung des Modellproteingehalts auf der fluorimetrischen Bestimmung des partikulär gebundenen Fluoreszenzlabels. Da durch die partikuläre Bindung und die pH-Sensitivität die Fluoreszenzintensität des Fluoresceinlabels abgeschwächt oder auch verstärkt werden könnte, sollte im Rahmen der folgenden Experimente durch festgelegte Ionenstärke- und pH-Bedingungen der Absolutgehalt an eingebautem Protein bestimmt werden. Dazu wird 1M Glycin/NaOH-Puffer pH 11,0 eingesetzt, der

einerseits die Polyestermatrix der Nanopartikel zu wasserlöslicher Milch- und Glykolsäure hydrolysiert, gleichzeitig die entstandenen sauren Produkte zusätzlich abpuffert und durch seine hohe Molarität eine Erhaltung des stark alkalischen pH-Wertes gewährleistet. Zusätzlich könnte auch das Modellprotein hydrolysiert werden, was zu einer verbesserten Zugänglichkeit bzw. auch Freisetzung des Fluorescein-labels und damit zu einer uneingeschränkten Fluoreszenzintensität führen könnte. Da jedoch die benötigte Hydrolysezeit unbekannt ist, sollte zunächst ein möglicher Proteinabsolutgehalt nach siebentägiger Hydrolyse bestimmt werden.

Die Versuche wurden wie in Kapitel 3.2.4. beschrieben mit Nanopartikeln mit calciumdefizitärem Hydroxyapatit und Tetracalciumphosphat in einfacher und doppelter Menge unter Einsatz von 4mg F-BSA als Modellprotein durchgeführt.

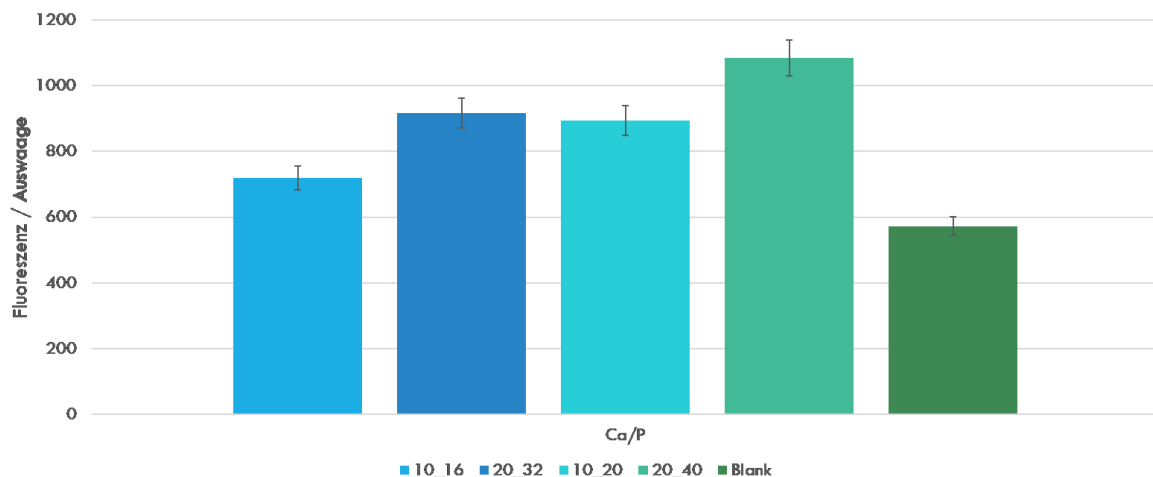


Abbildung 10: Modellproteingehalt von Hydroxyapatit/PLGA-Nanosphären nach siebentägiger Inkubation in Glycin/NaOH Puffer

Die Fluoreszenzausbeute der Nanopartikel mit einem Durchmesser von 91 nm nimmt nach siebentägiger Hydrolyse im stark alkalischen Milieu nur geringfügig zu. Bei Nanopartikeln mit calciumdefizitärem Hydroxyapatit beträgt sie 8% bzw. 3% (einfache bzw. doppelte Menge), jenen mit Tetracalciumphosphat 4% bzw. 10% (einfache bzw. doppelte Menge) und jenen ohne Hydroxyapatit 7 % verglichen mit den Partikeln aus Experiment 4.4. Obwohl die Fluoreszenzausbeute von freiem Fluorescein beim Übergang vom neutralen in den alkalischen Bereich zunimmt (E. Slyusareva, M.A. Gerasimova, L.M. Gornostaev, Spectral and fluorescent indication of the acid-base properties of biopolymer solutions. Russian Physics Journal, 54, 285-492 (2011)) weist die doch geringfügige Zunahme entweder auf eine nahezu vollständige Erfassung des Modellproteins oder eine, für eine vollständige Freilegung des Fluoreszenzlabels noch zu kurze Inkubationsspanne, hin.

Wie in den vorangegangenen Experimenten wird durch Gegenwart von Hydroxyapatit in den Nanosphären mehr Modellprotein gebunden, jedoch ist die Reihenfolge im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen geändert. Nanopartikel mit calciumdefizitärem Hydroxyapatit enthalten 128 % bzw. 161 % (einfache bzw. doppelte Menge), jene mit Tetracalciumphosphat 157 % bzw. 193 % (einfache bzw. doppelte Menge) Modellprotein verglichen mit Nanopartikeln ohne Hydroxyapatit (100 %).

4.6. Einfluss des Dispergiermediums auf die Einbaurate von F-BSA nach siebentägiger Inkubation in Glycin/NaOH Puffer

In Analogie zur Fragestellung in Kapitel 4.3. sollte auch hier der Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert durch Einsatz von 20mM HEPES Puffer pH 7 oder partikelfreiem, destilliertem Wasser als Dispergiermedium während Herstellung und Reinigung der Nanopartikel untersucht werden. Zusätzlich sollten Hinweise auf eine mögliche Zunahme der Fluoreszenzausbeute durch alkalische Bedingungen gesammelt werden.

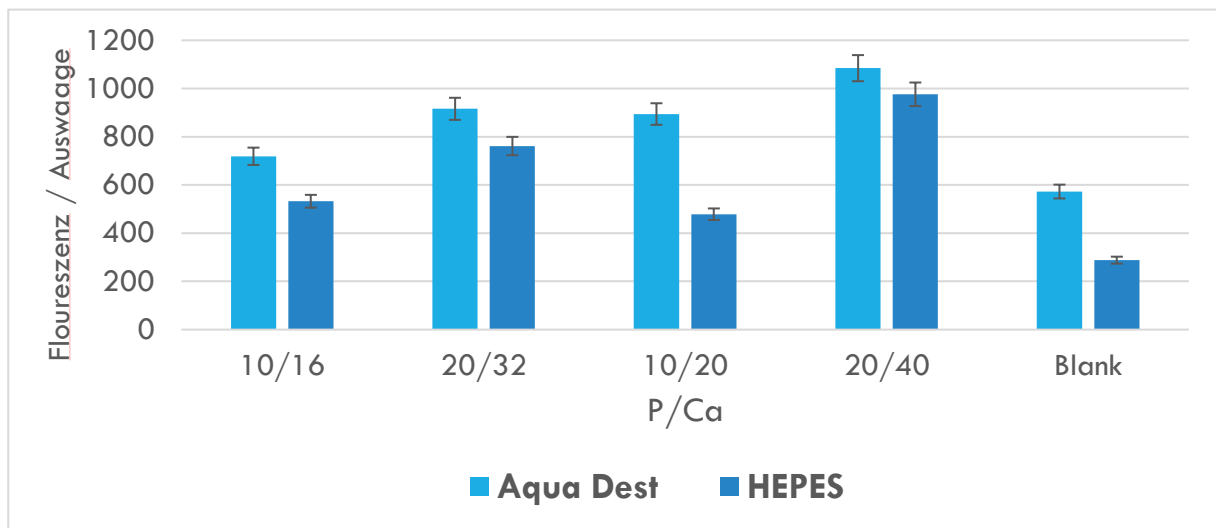


Abbildung 11: Einfluss des Dispergiermediums auf die Einbaurate von F-BSA nach siebentägiger Inkubation in Glycin/NaOH Puffer

Wie die in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse zeigen, ist partikelfreies, destilliertes Wasser als Dispergiermedium wesentlich besser geeignet als Puffer. Wird die Fluoreszenzausbeute innerhalb einer Versuchsserie als Maß für den Modellproteingehalt herangezogen, so ist sie im Schnitt bei Verwendung von Wasser

um 136 %, bei Verwendung von Puffer nur um 62 % höher als die Fluoreszenzausbeute der Nanopartikel ohne Hydroxyapatit.

Auffällig ist auch, dass laut den F-BSA Einbauraten wieder Nanopartikel mit der doppelten Menge an Tetracalciumphosphat die größten Mengen an F-BSA enthalten. Nanopartikel mit calciumdefizitärem Hydroxyapatit enthalten nach siebentägiger Inkubation im Alkalischen 184% bzw. 264% (einfache bzw. doppelte Menge), jene mit Tetracalciumphosphat 166% bzw. 332% (einfache bzw. doppelte Menge) Modellprotein verglichen mit Nanopartikeln ohne Hydroxyapatit (100%) bei Verwendung von Wasser als Dispergiermedium.

Ob eine siebentägige Inkubation in stark alkalischem Glycin/NaOH-Puffer für eine verlässliche Quantifizierung des Modellproteingehalts von Vorteil ist, kann mit diesem Experiment nicht geklärt werden. Verglichen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3. nimmt die Fluoreszenzintensität von hydroxyapatitfreien Partikeln um 40%, jene von hydroxyapatithältigen um 87% zu, wenn Puffer als Dispergiermedium eingesetzt wird. Wird jedoch partikelfreies Wasser als äußere Phase verwendet, dann nimmt die Fluoreszenzintensität ab; um 20% bei hydroxyapatithältigen und um 46 % bei hydroxyapatitfreien PLGA-Nanopartikeln.

4.7 Einfluss von Volumen und Inkubationsdauer mit 20mM Glycin/NaOH-Puffer pH 7,0 auf den Modellproteingehalt von hydroxyapatithältigen PLGA-Nanosphären

Aus den vorhergehenden Versuchen ist die optimale Inkubationsdauer und auch das optimale Puffervolumen nicht bekannt. In diesem Versuch, der mit PLGA-Nanopartikeln, die die einfache Menge an calciumdefizitären Hydroxyapatit und 4 mg F-BSA als Modellprotein enthalten, sollte einerseits die Inkubationsdauer bis auf zwei Monate und andererseits die Puffervolumina von 1,0, 1,5 und 2,0 ml pro Probe untersucht werden.

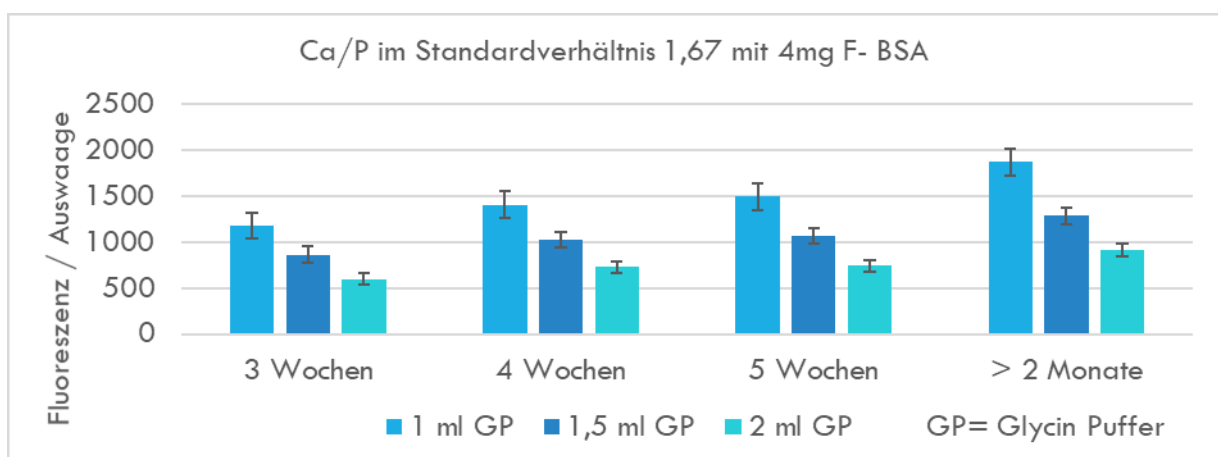


Abbildung 12: Einfluss von Volumen und Inkubationsdauer mit Glycin/NaOH-Puffer auf den Modellproteingehalt von hydroxyapatithältigen PLGA-Nanosphären

Unabhängig von der Verdünnungsstufe steigt die Fluoreszenzausbeute mit zunehmender Inkubationsdauer an und scheint auch nach zwei Monaten noch nicht das Maximum erreicht zu haben. Die

Polyestermatrix der Nanopartikel sollte nach zwei Monaten zur Gänze hydrolysiert sein, sodass möglicherweise noch Interaktionen zwischen Hydroxyapatit und adsorbiertem Modellprotein zum Tragen kommen. Elektrophoretische, elektronenmikroskopische und Partikelgrößen-Bestimmungen könnten hier Anhaltspunkte für die tatsächlichen Gegebenheiten liefern.

Die drei unterschiedlichen Volumina des Glycin/NaOH Puffers zeigen, wie in Abbildung 12 dargestellt, die Proportionalität zwischen Probenvolumen und Fluoreszenzintensität des Modellproteins. Es wird bei doppeltem Volumen an Medium die Hälfte der Proteinmenge im Gegensatz zum einfachen Volumen erhalten.

4.8 Modellproteingehalt von hydroxyapatithältigen und hydroxyapatitfreien PLGA-Nanosphären

Letztendlich sollte ein proof-of-the-concept gefunden werden, ob überhaupt und in welchem Ausmaß Hydroxyapatit eine Erhöhung der Einbaurate von hydrophilen Proteinen in eine hydrophobe Partikelmatrix bewirken kann.

In diesem Versuch wurden calciumdefizitäre Hydroxyapatit/PLGA-Nanosphären verwendet, wobei die Hydroxyapatit-Stammlösungen im einfachen Volumen eingesetzt werden. Als Modellprotein dienen 4 mg oder 10 mg F-BSA, als Vergleich jeweils Nanopartikel ohne Hydroxyapatit. Nach Reinigung und Lyophilisation wurden die Nanopartikel in 20mM Glycin/NaOH-Puffer pH 11 hydrolysiert und die Fluoreszenzausbeute als Maß für den Proteingehalt bestimmt.

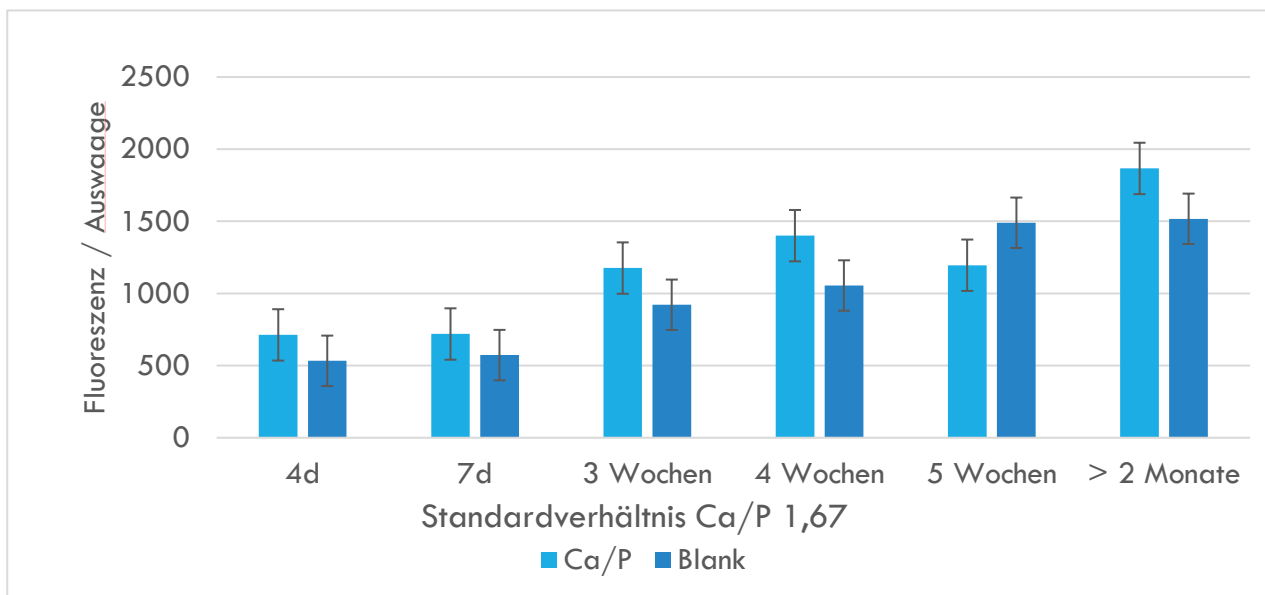


Abbildung 13: Modellproteingehalt von hydroxyapatithältigen und hydroxyapatitfreien PLGA-Nanosphären bei Einsatz von 4mg F- BSA

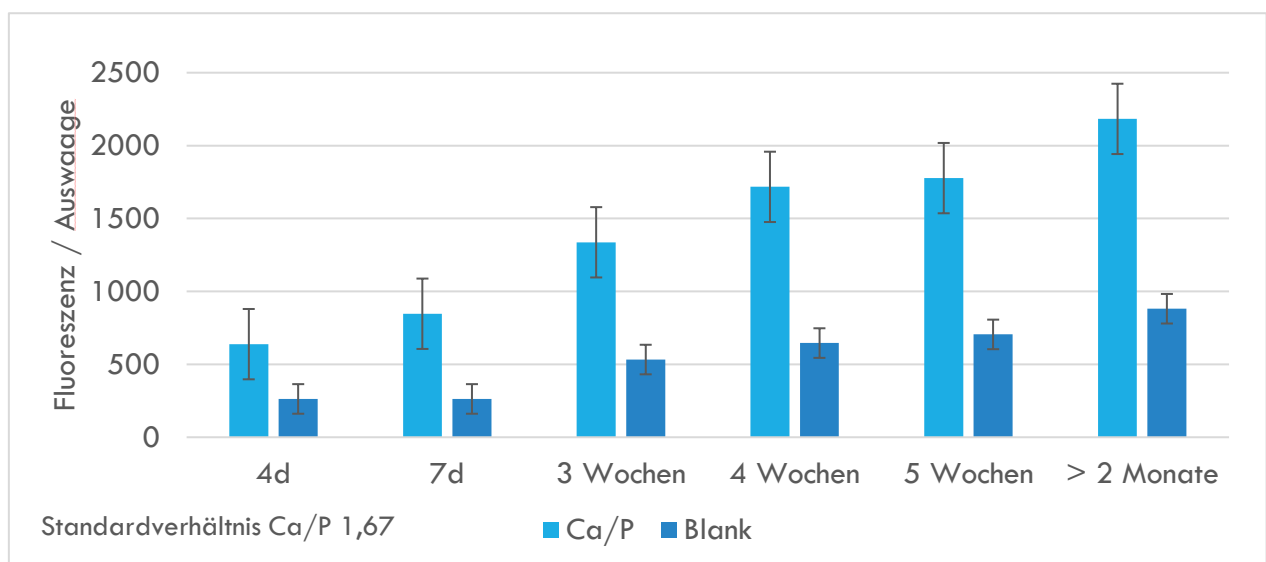


Abbildung 14: Modellproteingehalt von hydroxyapatithältigen PLGA-Nanosphären im Vergleich zu hydroxyapatitfreien bei Einsatz von 10 mg F-BSA

Bei Einsatz von 4 mg F-BSA als Modellprotein sind die Unterschiede im Proteingehalt zwischen hydroxyapatithältigen und hydroxyapatitfreien Nanopartikeln zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abbildung 13). Im Mittel ist jedoch der Proteingehalt von hydroxyapatithaltigen Nanopartikeln mit Ausnahme von den nach fünf Wochen analysierten Proben höher als ohne. Die Differenz im Proteingehalt zwischen apatitfreien und apatithaltigen Nanopartikeln beträgt etwa 30%, sodass bei Einsatz von 4mg Modellprotein durch Hydroxyapatit die 1,3-fache Menge in Nanopartikeln eingebaut wird.

Werden 10 mg F-BSA als Modellprotein eingesetzt, dann sind die Fluoreszenzausbeuten zwischen apatithaltigen und apatitfreien Nanopartikeln immer signifikant unterschiedlich (Abbildung 14). Im Durchschnitt ist der Proteingehalt der Hydroxyapatit-Nanosphären um $252 \pm 12\%$ höher als in den Vergleichspartikeln ohne Hydroxyapatit, sodass die PLGA-Nanosphären etwa die 3,5fache Menge an Protein enthalten, sobald Hydroxyapatit als hydrophiles Proteinadsorbens in der hydrophoben PLGA-Partikelmatrix vorliegt.

Demnach wird der positive Einfluss von Hydroxyapatit auf den Proteineinbau erst bei höheren Proteinkonzentrationen klar messbar, wobei eine 1,3 fache (4 mg F-BSA) bzw. 3,5 fache (10 mg F-BSA) Zunahme des Proteingehaltes durch Gegenwart von Hydroxyapatit den praktischen Nutzen eines hydrophilen Proteinadsorbens schlagkräftig unterstreichen.

Obwohl einige offene Fragen zu klären sind - beispielsweise der geringere Proteingehalt von hydroxyapatitfreien PLGA-Nanosphären bei Einsatz von 10 mg Protein verglichen mit 4 mg Protein - ist der beeindruckende Mehrgehalt an Protein ein profunder Hinweis, dass mit Hydroxyapatit als Hilfsstoff in einer Protein-feindlichen hydrophoben Matrix der Einbau von therapeutisch relevanten Proteinmengen möglich sein könnte.

5. Zusammenfassung

Der Einbau von hydrophilen Wirkstoffen, insbesondere aus der Biotech-pipeline, in hydrophobe Nanopartikel schafft die Basis für vielversprechende zukünftige Arzneiformen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von Hydroxyapatit als hydrophilem Adsorbens für ein Modellprotein in einer hydrophoben PLGA-Nanopartikelmatrix untersucht. Hydroxyapatit, der als calciumdefizitärer Typ und als Tetracalciumphosphat eingesetzt wird, beeinflusst die Größencharakteristik der Nanopartikel nicht. Der Partikeldurchmesser von etwa 80-100 Nanometer steigt jedoch mit zunehmender Beladung der Nanopartikel mit Modellprotein, die Partikelgrößenverteilung bleibt im monomodalen Bereich. Aufgrund von divergierenden Ergebnissen kann derzeit noch nicht festgelegt werden, welcher Hydroxyapatit-Typ besser geeignet ist. Als „proof-of-the-concept“ wird anhand von PLGA-Nanopartikeln mit calciumdefizitärem Hydroxyapatit experimentell nachgewiesen, dass bei Einsatz von 4 bzw. 10 mg Modellprotein die 1,3fache bzw. 3,5fache Menge an Modellprotein in die Nanopartikel eingebaut wird.

Obwohl noch viele offene Fragen zu klären sind, wird in dieser Arbeit die Machbarkeit des Konzeptes belegt, das in Zukunft ein großes Potential für die Entwicklung von Arzneiformen für therapeutische Peptide und Proteine besitzt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Dördelmann G., Kozlova D., Karczewski S., Lizio R., Knauer S., Eppele M., 2014. Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery, *Journal of Materials Chemistry B*, 7250 - 7259
- [2] Moghimi Moein S., Hunter Christy A., Murray Clifford J., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects, Review, *The FASEB Journal*, 311 - 314
- [3] Kumar Ganesh C., Poornachandra Y., Pombala S., 2017. Chapter 1 - Therapeutic nanomaterials: from a drug delivery perspective, *Nanostructures for Drug Delivery*, edited by: Andronesu E., Grumezescu Mihai A., 1. Auflage, Amsterdam, Oxford, Cambridge, ScienceDirect Elsevier Inc., 1 - 61
- [4] Khan, I et al., 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, Review, *Arabian Journal of Chemistry*
- [5] Rim Pyeong H., Min Hyun K., Lee Jae H., Joeng Young S., Lee Cheon S., 2011. pH- Tunable Calcium Phosphate Covered Mesoporous Silica Nanocontainers for Intracellular Controlled Release of Guest Drugs, *Angewandte Chemie - International Edition*
- [6] Makadia K.H., Siegel S.J., 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *NIH Author Manuscript* 1377 - 1397
- [7] Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Le Breton A., Preat V., 2012. Review: PLGA- based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 506 - 522
- [8] Okada M., Furuzono T., 2012. Topical Review: Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications, *Science and Technology of Advanced Materials*, 13

- [9] Holowachuk E.W., Stoltenborg J.K., Reed R.G., Peters T. Jr., 1991. Bovine serum albumin: cDNA sequence and expression, <https://www.uniprot.org/uniprot/P02769/publications?query=&fil=>, 05.08.2019
- [10] Santander- Ortega M.J., Jodar- Reyes A.B., Csaba N., Bastos- Gonzalez D., Ortega- Vinuesa J.L., 2006. Colloidal stability of Pluronic F68- coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms, ScienceDirect 302 (2006) 522 - 529
- [11] R. Voigt. Pharmazeutische Technologie, Für Studium und Beruf. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 9. Auflage, 23-24, 2000.